

## アセチルコリン受容体合成ペプチドの立体構造修飾と 抗原性に関する研究

—受容体 $\alpha$ サブユニット残基番号67~76領域を中心として—

金沢大学医学部神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

濱 田 敏 夫

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) の発症過程で中心的役割を演ずる抗アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) 抗体の抗原決定基のうち, 特に受容体崩壊促進作用を担う抗体の標的として, 生体膜上の AChR $\alpha$ 67~76 領域 (main immunogenic region, MIR) が重要視されているが, この領域を合成したペプチドは必ずしも十分な抗原性を示すに至っていない. この MIR の合成ペプチドの抗原性を強調するために, 合成ペプチドに Cys を組み込み S-S 結合をとらせ, 抗原決定基であるために重要と思われるターン構造の強調を試みたペプチド, KKCYG- $\alpha$ 67~76-VCT, CR- $\alpha$ 67~76-K( $G^{74}\rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha$ 67~76-KC [核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) 法による立体構造解析でターン構造をとることを確認した.], KKC- $\alpha$ 63~77-C, KKC- $\alpha$ 62~77-C, KKC- $\alpha$ 61~77-C, また, 抗原性強調に有効と報告されたアミノ酸置換を, S-S 結合を組み込んだ合成ペプチドに応用した KKC- $\alpha$ 62~77-C ( $G^{73}\rightarrow H$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$ 62~77-C ( $G^{73}\rightarrow R$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$ 62~77-C ( $K^{78}\rightarrow H$ ), KKC- $\alpha$ 62~77-C ( $K^{78}\rightarrow R$ ) を作製し, その抗原性を検討した. まず抗 MIR モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) との反応を ELISA 法にて検討した結果, 構造修飾されない  $\alpha$ 67~76,  $\alpha$ 60~80 に反応性を認めなかったが, 構造修飾された CKGGLR- $\alpha$ 67~76-KC, KKC- $\alpha$ 63~77-C, KKC- $\alpha$ 62~77-C, KKC- $\alpha$ 61~77-C に強い反応を認めた. また, アミノ酸置換を行ったペプチドも全てに強い反応を認め, 特に KKC- $\alpha$ 62~77-C ( $K^{78}\rightarrow H$ ) はアミノ酸置換を行わないものの反応を上回るものであった. 一方, 30例の MG 患者血清抗体との反応を二抗体免疫沈殿法にて検討した結果,  $\alpha$ 60~80 およびアミノ酸置換と構造修飾両者を受けたペプチドに陽性例はなかったが, アミノ酸置換をせずに構造修飾のみを受けたペプチドに 3.3%~16.7% の陽性例を認めた. 以上, 抗 MIR mAb に対する合成ペプチドの抗原性強調は, ターン構造を強調する目的の S-S 結合組み込み単独, アミノ酸置換の併用, 両者で有効なものがあることが示され, MG 患者血清抗体に対する合成ペプチドの抗原性強調では, S-S 結合組み込み単独のものに有効なものがあることが示された. これらは, 合成ペプチドを用いる際の立体構造への配慮の重要性を示し, また, 断片化されたペプチドに見られる抗原性低下の克服に, 立体構造修飾が有効であることを示している. 合成ペプチドを抗原抗体反応を利用した吸着剤として, 液性免疫が主病因とされる自己免疫疾患の血液浄化療法に応用する際に, 立体構造修飾は合成ペプチドの抗原性強調のために考慮されるべき方法と思われる.

**Key words** myasthenia gravis, main immunogenic region, synthetic peptide

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は神経筋接合部シナプス後膜のアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) に対する抗体によって引き起こされる自己免疫疾患である. 抗 AChR 抗体はアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 結合障害, AChR 崩壊促進, 補体介在性運動終板膜破壊の3機序をもって神経筋興奮伝達を障害し, 脱力を引き起こす<sup>1)</sup>. この自己免疫疾患の抗原決定基が AChR のどの部位であるかは, 病態解明, 治療の面から重要な問題である.

シビレエイの電気器官や, 哺乳動物の筋肉のニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic AChR, nAChR) は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  の4種のサブユニットからなり,  $\alpha\beta\gamma\delta$  の五量体構造をとっている. 近年, AChR 各サブユニットのアミノ酸配列が明らかにされ<sup>2)</sup>,

各サブユニットの一次構造と, 膜外, 膜貫通, 膜内配列の推定が行われた<sup>3~6)</sup>. この知見は, 細胞膜外に存在する抗 AChR 抗体の抗原決定基の局在を予測する一助となる. さらに, AChR に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) の活用から, 抗 AChR 抗体の60%以上が $\alpha$ サブユニット上の或る領域, いわゆる主要免疫原性領域 (main immunogenic region, MIR) に抗原決定基を有することが報告された<sup>9~12)</sup>. その後, AChR のアミノ酸配列の一部をペプチドとして合成し, これを抗原に応用する手法が導入され, 抗 MIR mAb との反応が調べられた結果, MIR が  $\alpha$ 67~76 とかなり限られた領域にしばらくることが報告された<sup>13)</sup>. このことは, 治療を考えるうえで非常に利点となるが, mAb を用いた検討では合成ペプチ

平成6年12月14日受付, 平成7年3月14日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptor; BSA, bovine serum albumin; COSY, 2D correlated spectroscopy; DMSO, dimethylsulfoxide; EMAG, experimental autoimmune myasthenia gravis; HPLC, high performance liquid chromatography; mAb, monoclonal antibody; MG, myasthenia gravis; MIR,

ド  $\alpha 67 \sim 76$  の抗原性は天然 AChR に比して非常に弱いこと、合成ペプチド  $\alpha 67 \sim 76$  を抗原としてヒト抗体を十分に検知したとの報告に乏しいことは、合成ペプチドを用いる際の問題点となっている。

合成ペプチドの抗原性減弱の原因の一つに、抗原を断片化したペプチドにすることによる立体構造の変化が考えられる。 $\alpha 67 \sim 76$  の理論的に予測される立体構造は、 $\alpha 68 \sim 71$  にループの頂点を持つヘアピンループ構造で、ループの頂点は I 型  $\beta$  ターン構造をとることが予測されている。そして、そのターン部分は陰性荷電を有し、親水性であることも抗体の結合部位として適当である<sup>14)</sup>。我々はこのターン構造が抗原性に重要と考え、人工的に S-S 結合をペプチドに組み込んでターン構造を強調し、断片化された合成ペプチドの抗原性低下を克服することを試みた。その結果、抗 MIR mAb に対する抗原性強調に成功し、その抗原性を強調した合成ペプチドを用いて、無修飾のペプチドでは困難であったヒト MG 患者血清抗体の検出を試みた。

## 材料および方法

### 1. ペプチド合成

ヒトおよびシビレエイ (torpedo) の AChR $\alpha$  サブユニット前駆体一次構造<sup>1)</sup>に照合し、Tzartos らにより MIR とされている  $\alpha 67 \sim 76$ <sup>15)</sup>、その両端に天然アミノ酸配列を延長した  $\alpha 60 \sim 80$ 、AChR 崩壊促進作用を有する抗体を誘導できると報告された  $\alpha 125 \sim 147$ <sup>16)</sup>、 $\alpha 70 \sim 90$ <sup>18)</sup>、ACh 結合能を阻害する抗体を誘導できると報告された  $\alpha 183 \sim 200$ <sup>17)</sup>、そのほか表 1 の如く 20 種のペプチドを合成した。 $\alpha 67 \sim 76$  に関しては、そのターン構造を強調するため人工的なアミノ酸配列を追加したうえで両端に Cys を付加し、S-S 結合をとらせた合成ペプチド、KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT、CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ) (74 残基位の G を C に置換したことを意味する)、CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC を作製した。Cys を組み込んだ 3 種の合成ペプチドの予測構造式は図 1 に示した。また、 $\alpha 67 \sim 76$  を中心に天然アミノ酸配列を延長し、本来のアミノ酸配列の両端に Cys を組み込み、この延長を少しずつ変えてターンの位置を変化させることを意図した KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C、KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C を作製した。この 3 種の予測構造式は図 1 に示した。このほか、図 1 に見られるようにターンの位置が  $\alpha 68 \sim 71$  に予測される KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C に関しては、 $Gly^{73}$ 、 $Lys^{76}$  を他のアミノ酸に置換したペプチド、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow H$ 、 $K^{76} \rightarrow A$ )、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow R$ 、 $K^{76} \rightarrow A$ )、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow H$ )、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow R$ ) をヒトアミノ酸配列においてのみ作製した。ペプチドの一部には可溶性をうために N 端に Lys-Lys または、Lys-Lys-Gly、C 端に Gly または Lys-Lys-Gly を連結した。これらのペプチドを固相法で作製し、逆相高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) にて精製した。またその後、日本電子製 (東京) HX-100 によるフィールドディソープション法 (イオン化方法) マススペクトルでペプチド合成を確認した。S-S 結合は、フェリシアン化カリウム酸化法によって形成した。その過程を逆相 HPLC でモニターし、逆相 HPLC にてペプチドを精製した。またその後、最終的にマス

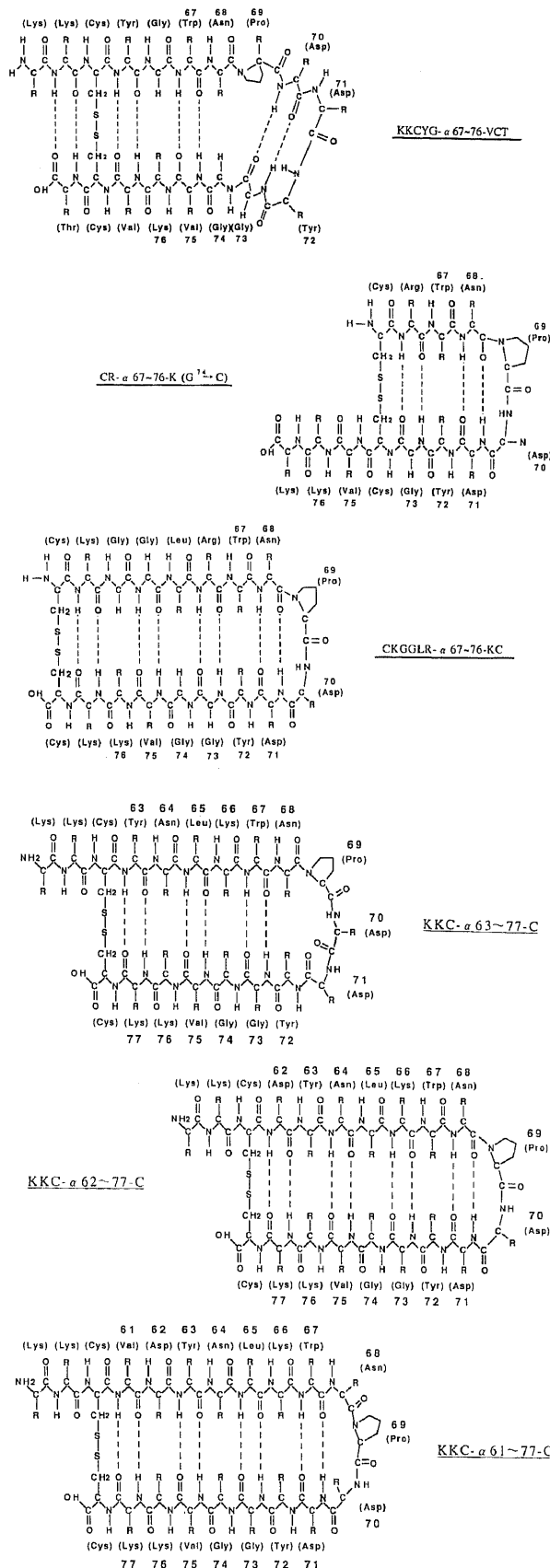


Fig. 1. Structural formulae of synthetic peptides.

main immunogenic region; NMR, nuclear magnetic resonance; NOESY, 2D nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; T, Tween

ペプチドによる分子量測定でペプチド合成を確認した。

## II. mAb

Mayo clinic (Rochester, Minnesota, USA) の Lennon 博士より供与された抗 MIR mAb (mAb3), 抗 non-MIR mAb (mAb1) を使用した。これらの mAbs は, *Torpedo californica* の電気器官から精製した AChR をルウィスラットに免疫し, リンパ節から得たリンパ球と免疫グロブリン非産生マウスミエローマ細胞 S194/5.XXO.BU.1 をポリエチレングリコールを用いて融合, AChR 抗体産生細胞をクローン化し, 雄先天性無胸腺 BALB/c スード (nu/nu) マウス (ARS Sprague-Dawley) の腹腔内に接種, 得られた腹水を40%硫酸アンモニウムに沈殿分離した<sup>18)19)</sup>。mAb3 に関しては, ラット, ヒト, ギニアビッグ, イヌ, ネコ, マウスの AChR の, <sup>125</sup>I- $\alpha$ -ブングロトキシン結合部位と異なる部位に結合すること, 実験的自己免疫性重症筋無力症 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) を惹起すること, 培養細胞上の AChR の崩壊を促進すること, mAb35<sup>10)</sup> と競合することによって, 抗 MIR mAb であることを証明した<sup>20)</sup>。

## III. ELISA

合成ペプチドを 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.5) に 750pmol/ml で溶解し, 96穴 ELISA プレート, イムノプレート II (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウェルに 100 $\mu$ l ずつ分注して, 4℃で一晩インキュベーションした。その後0.05% トゥイーン20加 PBS (PBS/Tween, PBS/T) で3回洗浄し, 一次抗体として mAb を PBS/T 10% ヤギ血清で 500 $\times$ 2<sup>6</sup>~500 $\times$ 2<sup>7</sup> 倍の希釈系列を作製し各ウェルに分注して, 37℃で1.5時間インキュベーションした。その後 PBS/T で3回洗浄し, 二次抗体としてのアルカリ

フォスファターゼ標識ヤギ抗ラット IgG (重鎖+軽鎖) (Bio-Rad, Richmond, USA) を PBS/T 10% ヤギ血清で500倍希釈して添加して, 37℃で1時間インキュベーションした。その後 PBS/T で3回洗浄し, 10% ジェタノールアミン緩衝液 (Bio-Rad) に P-ニトロフェニルリン酸 (Bio-Rad) を 5mg/5ml 溶解したものを基質として添加して, 37℃で1.5時間インキュベーションした。その後 IN NaOH を 50 $\mu$ l 各ウェルに分注して反応を止め, 405nm で吸光度を測定した。抗体価は, mAb1 に対する mAb3 の吸光度の比が2.5以上となる最高希釈倍率とした。また, ELISA プレートへの合成ペプチドの固相化の成否は, Griesmann らの方法によって確認した<sup>21)</sup>。

## IV. 二抗体免疫沈殿法

所定の試験管中の Bolton-Hunter 試薬<sup>22)</sup> (0.5mCi) (Amersham, Buckinghamshire, England) の溶媒のベンゼンを窒素ガスで蒸発させ, 合成ペプチド 5 $\mu$ g を 0.05M リン酸緩衝液 (phosphate-buffer, PB) (pH7.5) 10 $\mu$ l 中に溶解し, 注入した。これを 0℃で1時間, その後4℃で一晩反応させた。これに 0.1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 加 0.05M PBS500 $\mu$ l を加えた反応液全体をセファデックス G-15 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) カラム (1.0 $\times$ 30cm) (Econocolumn, Bio-Rad) にのせ, 0.1%BSA 加 0.05M PB でゲル濾過し, 放射能のピークをとり標識抗原とした。

血清1検体につき栄研チューブ (栄研, 東京) 3本用意し, 0.05M PB で100倍希釈した被検血清を 100 $\mu$ l ずつ3本に分注し, それぞれに標識抗原 100 $\mu$ l (20~50 万 cpm/試験管, 比活性 1.0~4.7 $\times$ 10<sup>7</sup>cpm/ $\mu$ g) を分注して4℃で一晩反応させた。次に二次抗体としてのヤギ抗ヒト IgG (全分子) (Cappel Laboratories, Pennsylvania, USA) を 0.05M PB で2倍希釈し, それぞれ

Table 1. Synthetic peptides of the  $\alpha$ -subunit of the AChR

Synthetic AChR peptide	Amino acid sequence in	
	Torpedo	Human
$\alpha$ 1~24-G		SEHETRLVAKLFKDYSSVVRPVEDG
$\alpha$ 107~116-G	KLLLDYTGKIG	
KKG- $\alpha$ 124~147	KKGFKSYCEIIVTHFPFDQQNCTMKLG	
KKG- $\alpha$ 125~147		KKGKSYCEIIVTHFPFDEQNCMKLG
KK- $\alpha$ 183~200-KKG	KKGWKHWVYYTCCPDTPYLDKKG	
KK- $\alpha$ 183~200-G		KKGWKHSVTYSCCPDTPYLDG
KK- $\alpha$ 51~71-G	KKETNVRLRQQWIDVRLRWNPAD	KKTTNVRLKQQWVDYNLKWNPDDG
KK- $\alpha$ 70~90-G	KKADYGGIKIRLPSDDVWLPDLG	KKDDYGGVKKIHIPSEKIWRPDLG
$\alpha$ 60~80-G	WIDVRLRWNPADYGGIKIRLG	WVDYNLKWNPDDYGGVKKIHIG
$\alpha$ 67~76	WNPADYGGIK	
KKCYG- $\alpha$ 67~76-VCT	KKCYGWNPADYGGIKVCT	KKCYGWNPDYGGVVKVCT
CR- $\alpha$ 67~76-K (G <sup>74</sup> →C)	CRWNPADYGGIKK	CRWNPDDYGGVKK
CKGGLR- $\alpha$ 67~76-KC	CKGGLRWNPADYGGIKKC	CKGGLRWNPDYGGVKKC
KKC- $\alpha$ 63~77-C	KKCVRLRWNPADYGGIKKC	KKCYNLKWNPDDYGGVKKC
KKC- $\alpha$ 62~77-C	KKCDVRLRWNPADYGGIKKC	KKCDYNLKWNPDDYGGVKKC
KKC- $\alpha$ 61~77-C	KKCIDVRLRWNPADYGGIKKC	KKCDYNLKWNPDDYGGVKKC
KKC- $\alpha$ 62~77-C (G <sup>73</sup> →H, K <sup>76</sup> →A)		KKCDYNLKWNPDDYHGVAKC
KKC- $\alpha$ 62~77-C (G <sup>73</sup> →R, K <sup>76</sup> →A)		KKCDYNLKWNPDDYRGVAKC
KKC- $\alpha$ 62~77-C (K <sup>76</sup> →H)		KKCDYNLKWNPDDYGGVHKC
KKC- $\alpha$ 62~77-C (K <sup>76</sup> →R)		KKCDYNLKWNPDDYGGVRKC

Their sequence are shown using standard one-letter amino acid symbolism. The single letter notations of the amino acids are: A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

の試験管に 50 $\mu$ l 分注, 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. その後, 3,000 rpm で10分間遠心し上清を捨て, 沈査は0.2% トリトン X 加 0.05M Tris 緩衝液 (pH7.4) で2回洗浄後, 放射活性を測定した.

#### V. 立体構造解析

0.005M で合成ペプチドを軽水 ( $H_2O:D_2O=9:1$ ) に溶解し, JEOL GX-500 スペクトロメーター (日本電子) を用いて, 一次元, 二次元核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) スペクトルを, 二次元相関分光法 (2D correlated spectroscopy, COSY), 二次元核オーバーハウザー効果-交換分光法 (2D nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy, NOESY) によって得た. NOESY スペクトルは混合時間 200ms で記録した. 軽水シグナルの抑制はホモゲートデカップリングによって行った. 得られた各ピークのアミノ酸配列への帰属は Wüthrich の方法で行った<sup>23</sup>. また, 得られたプロトン間距離情報を基に, Braun らの方法<sup>24</sup> によるディスタンス・ジオメトリで系統的に解析し, 水溶液中での立体構造をコンピュータ画像で描出した.

Table 2. Reactivity of anti-Torpedo MIR monoclonal antibody with Torpedo and human AChR peptides

Synthetic AChR peptide	Reciprocal of final dilution-positive
(Torpedo)	
$\alpha 107 \sim 116-G$	<500
KKG- $\alpha 124 \sim 147$	<500
KK- $\alpha 183 \sim 200-KKG$	<500
KK- $\alpha 51 \sim 71-G$	<500
KK- $\alpha 70 \sim 90-G$	<500
$\alpha 60 \sim 80-G$	<500
$\alpha 67 \sim 76$	<500
KKCYG- $\alpha 67 \sim 76-VCT$	<500
CR- $\alpha 67 \sim 76-K (G^{74} \rightarrow C)$	<500
CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76-KC$	4,000
KKC- $\alpha 63 \sim 77-C$	4,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C$	16,000
KKC- $\alpha 61 \sim 77-C$	4,000
(Human)	
$\alpha 1 \sim 24-G$	<500
KKG- $\alpha 125 \sim 147$	<500
KK- $\alpha 183 \sim 200-G$	<500
KK- $\alpha 51 \sim 71-G$	<500
KK- $\alpha 70 \sim 90-G$	<500
$\alpha 60 \sim 80-G$	<500
KKCYG- $\alpha 67 \sim 76-VCT$	<500
CR- $\alpha 67 \sim 76-K (G^{74} \rightarrow C)$	<500
CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76-KC$	4,000
KKC- $\alpha 63 \sim 77-C$	16,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C$	32,000
KKC- $\alpha 61 \sim 77-C$	32,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (G^{73} \rightarrow H, K^{76} \rightarrow A)$	32,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (G^{73} \rightarrow R, K^{76} \rightarrow A)$	32,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (K^{76} \rightarrow H)$	64,000
KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (K^{76} \rightarrow R)$	16,000

The antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution that yielded an adsorbance of 2.5 times the mean value for the corresponding dilution of anti-Torpedo non-MIR monoclonal antibody.

#### VI. 患者血清

血清は-80 $^{\circ}$ C で保存されたものを使用した. AChR 結合抗体陽性の重症筋無力症30例を対象とし, 対照には健康成人15例, 他の神経疾患10例 (Guillain-Barré 症候群 1 例, Fisher 症候群 2 例, 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー 2 例, 皮膚筋炎 3 例, 筋萎縮性側索硬化症 2 例) を用いた.

#### 成 績

##### I. 合成ペプチドと抗MIR モノクローナル抗体の反応

抗 non-MIR mAb (mAb1) を対照にし, 抗 MIR mAb (mAb3) と合成ペプチドの反応を調べた結果を表2に示した. 抗 MIR mAb は MIR とされる  $\alpha 67 \sim 76$  と関連のないペプチドとは反応を示さなかった. また, MIR であるはずの  $\alpha 60 \sim 80$ ,  $\alpha 67 \sim 76$  にも反応を示さなかった. 一方, ターン構造を強調すべく構造修飾された合成ペプチドの中で, CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76-KC$ , KKC- $\alpha 63 \sim 77-C$ , KKC- $\alpha 62 \sim 77-C$ , KKC- $\alpha 61 \sim 77-C$  が抗 MIR mAb と反応を示し, これらの構造修飾は, 抗 MIR mAb に対する抗原性の回復に効果的であった. またこの4種のペプチドはシビレエイ, ヒトアミノ酸配列それぞれに作製して調べたが, 抗 MIR mAb との反応は程度の差はあれ, 両者で異ならなかった.

反応を示した4種のペプチドの中では, 人工的なアミノ酸配列を付加した CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76-KC$  よりも, 天然アミノ酸配列を付加した3種の方が反応が強い傾向にあった. この3種の中でもっとも反応の強い傾向にあったのは, MIR のターン部位として理論的に予測される  $\alpha 68 \sim 71$  と同部位にターンを有するであろう KKC- $\alpha 62 \sim 77-C$  である. このペプチドにアミノ酸置換をほどこしたヒト合成ペプチド, KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (G^{73} \rightarrow H, K^{76} \rightarrow A)$ , KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (G^{73} \rightarrow R, K^{76} \rightarrow A)$ , KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (K^{76} \rightarrow H)$ , KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (K^{76} \rightarrow R)$  に関しても, 同様に抗 MIR mAb との反応が得られ, 特に KKC- $\alpha 62 \sim 77-C (K^{76} \rightarrow H)$  は KKC- $\alpha 62 \sim 77-C$  の反応を上回るものであった.

##### II. ペプチド立体構造解析

抗 MIR mAb (mAb3) と反応した合成ペプチドの一つ CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76-KC$  を NMR 法により構造解析し, 得られた

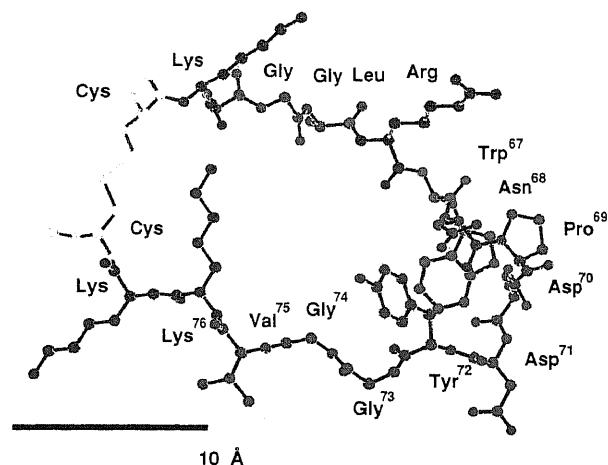


Fig. 2. Conformation of the human  $\alpha 67 \sim 76$  MIR decapeptides (WNPDDYGGVK) in the aqueous solution as revealed by 2D-NMR experiments and molecular dynamics analysis. The hydrogen is omitted in this figure.

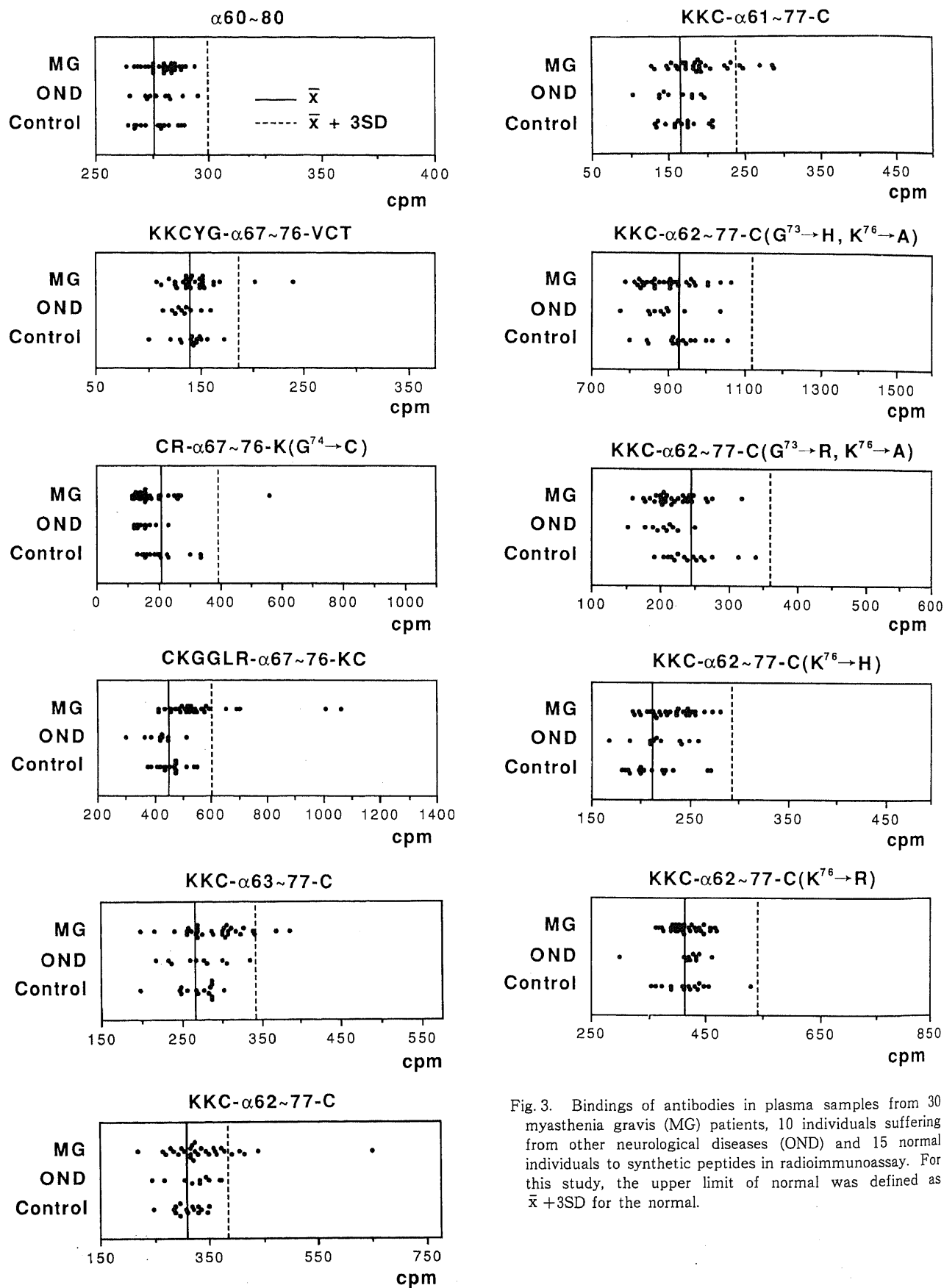


Fig. 3. Bindings of antibodies in plasma samples from 30 myasthenia gravis (MG) patients, 10 individuals suffering from other neurological diseases (OND) and 15 normal individuals to synthetic peptides in radioimmunoassay. For this study, the upper limit of normal was defined as  $\bar{x} + 3SD$  for the normal.

立体構造のコンピュータ画像を図2に示した。合成時の意図通り S-S 結合を有し、 $\alpha 68 \sim 71$  でターン構造をとることが示された。

### Ⅲ. 合成ペプチドとヒトMG 患者血清抗体の反応

合成ペプチド、 $\alpha 60 \sim 80$ , KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT, CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC, KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow H$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow R$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow H$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow R$ ) を  $^{125}I$  で標識し、二抗体免疫沈殿法で MG 患者血清30例との反応を調べた結果を図3に示した。健康成人15例の  $\bar{x} + 3SD$  を正常上限として判定した。構造修飾されない  $\alpha 60 \sim 80$  には有意な反応が得られなかったが、ターン構造を強調すべく構造修飾されたペプチドには KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT 2 例 (6.7%), CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ) 1 例 (3.3%), CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC 5 例 (16.7%), KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C 2 例 (6.7%), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C 5 例 (16.7%), KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C 5 例 (16.7%) の陽性例を認めた。一方で、抗 MIR mAb との反応の高かった KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C にアミノ酸置換を加えた KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow H$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow R$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow H$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow R$ ) には陽性例を認めなかった。いずれのペプチドにおいても対照疾患群に陽性例は認めなかった。

## 考 察

MG 患者血清中の抗 AChR 抗体が、AChR 中のどの領域を抗原決定基とするかについて分子レベルでの検討が進められている。特に  $\alpha$  サブユニットの或る領域、いわゆる MIR は、MG 患者血清抗体の約60%が認識する部位として Tzartos らにより報告され注目されている<sup>19)</sup>。彼らは、天然 AChR を免疫して得られた mAb の多くが  $\alpha$  サブユニット上の或る一つの領域 (MIR) に反応することを、mAb 同士の競合実験で明らかにし、その抗 MIR mAb の反応が抗原の種を越えて広く保たれること、抗 MIR mAb が EAMG を惹起する能力を持つこと、抗 MIR mAb が培養細胞上の AChR の崩壊を促進することを示し、MIR の重要性を強調している。この MIR は ACh の受容体結合部位とは異なり、また、MIR への抗体結合だけでは AChR の機能が妨げられないことが知られている<sup>20)</sup>。抗 MIR mAb の抗原決定基は徐々にその範囲が狭められ、やがて合成ペプチドを用いた実験から  $\alpha 67 \sim 76$  へとしばりこまれてきた<sup>19)</sup>。しかし、断片化した合成ペプチドと抗 MIR mAb の反応は、天然 AChR に比し非常に弱い。

今回の検討においても、抗 MIR mAb (mAb3) が MIR であるはずの  $\alpha 60 \sim 80$ ,  $\alpha 67 \sim 76$  に反応を示さなかった。このことは、抗 MIR 抗体の指標にもされている Tzartos らの mAb35<sup>19)</sup> が合成ペプチドに反応しないことに類似しており<sup>19)</sup>、断片化したペプチドを抗原とすることから生じた問題と思われる。

断片化されたことで抗原性を減じた原因として、立体構造に変化が起き抗原性が弱められる可能性、あるいは抗原決定基が複数の不連続なアミノ酸残基の3次元的集合体として形成され、一部のアミノ酸配列だけでは十分な抗原性を持たせられない可能性などが原因として考えられる。前者の可能性に対しては、立体構造の修飾を行うことで抗原性の回復を期待できるかも知れない。

立体構造修飾の前提として、まず、MIR の立体構造解析が必要と思われる。MIR とされる  $\alpha 67 \sim 76$  に関して、そのアミノ酸配列から理論的に予測される構造は I 型  $\beta$  ターン構造であり、元来抗原決定基になりやすいとされているループ構造に望ましいものである<sup>14,20)</sup>。Cung らは NMR 法によって合成ペプチド  $\alpha 67 \sim 76$  の立体構造解析を行い、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) 中では、実際にターン構造をとることを報告している<sup>21)</sup>。我々は MIR が抗原となるにはターン構造が重要との考えから、ターンを強調するために S-S 結合を合成ペプチドに組み込み、抗 MIR mAb と合成ペプチド  $\alpha 67 \sim 76$  の反応性を高めることに成功した。このことは合成ペプチドを用いる際に、立体構造修飾で mAb との反応性を高めることが可能であることを示しており、また、合成ペプチド  $\alpha 67 \sim 76$  の抗 MIR mAb への抗原性が減弱する原因の一つに、立体構造の変化が関与することを支持する知見と思われる。

我々が用いた構造修飾は、断片化したペプチドにターン構造を確保することが第一の目的であった。この構造修飾の成否に関しては、実際に CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC が、水溶液中で S-S 結合を有し、ターン構造をとることを NMR 法による構造解析で示した。これに関連して興味深いのは、Cung らの  $\alpha 67 \sim 76$  の NMR 法での解析は溶媒が DMSO であり、水溶液中ではプロトン間オーバーハウザー効果が得られず、合成ペプチドの構造解析ができなかったと報告していることである<sup>21)</sup>。その理由として、水溶液中では水分子の極性により合成ペプチド中の分子間水素結合が不安定となり、安定した立体構造を保てないからではないかと推測している。今回我々が、水溶液中での構造解析に成功した理由として、S-S 結合でペプチドの立体構造を安定化させたこと、つまりはターン構造を安定化させたことが一つの原因として考えられる。

抗原性の強調に関し、我々は当初 MIR ( $\alpha 67 \sim 76$ ) そのもののアミノ酸配列を乱すことなく抗原性を強調することを試みた。これに対し、Papadoulis らは  $\alpha 67 \sim 76$  のアミノ酸残基の点突然変異を作製し、Lys<sup>76</sup>→Ala<sup>76</sup>等のある種の置換が抗 MIR mAb との反応を強調することを見いだしている<sup>22)</sup>。NMR 法での解析では、Lys<sup>76</sup>→Ala<sup>76</sup>の置換により、 $\alpha 67 \sim 76$  の C 端側の柔軟性が高まることを見いだされ、抗体との結合により有利となるのではないかと推測されている<sup>23)</sup>。このことは、我々が、S-S 結合で安定したターン構造を目指したことと関連して興味深い。同様の点突然変異での mAb に対する抗原性強調に関して、Lys<sup>76</sup>→His<sup>76</sup>, Arg<sup>76</sup>等が有効であることも報告されている<sup>20)</sup>。しかし、これらが立体構造にどのような修飾を与えたかに関しての検討はなされていない。

これらの置換の一部については、我々の S-S 結合を利用して作製したペプチドの中でもっとも抗原性の強い傾向にあった KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C にも応用され、抗 MIR mAb との反応強調において、K<sup>76</sup>→H が有効であることが示された。このことは、アミノ酸置換が S-S 結合を有した合成ペプチドにも試みる価値のある方法であることを示している。

以上の結果は、mAb と合成ペプチドに関してのものであり、これらが最終的に治療に反映されるには、患者血清抗体と反応し得るものである必要がある。これに関し、MG 患者血清中の AChR 抗体の検出に構造修飾した合成ペプチドが有用かどうかを検索し、アミノ酸置換を行わなかったものに 3.3%～16.7% の陽性率を得た。これまで、MIR を含む断片化された合

成ペプチドでは、MG 患者血清抗体を十分に検出したとする報告はない。Lennon らは、 $\alpha 65 \sim 80$  に MG 23 例の検体の一例も反応しなかったことを記載しており、同時に患者血清は変性 AChR や、個々のサブユニットに反応しないことを記載している<sup>20)</sup>。また、Barkas らも  $\alpha 61 \sim 76$  と患者血清の反応を、測定困難と報告している<sup>31)</sup>。唯一 Ashizawa ら<sup>32)</sup>が  $\alpha 47 \sim 77$  に弱い反応があると報告しており、これは患者血清が完全な AChR 以外に反応しないとする Lennon ら<sup>20)</sup>の報告に反するが、測定法の違いもその原因の一つに考えられる。今回の我々の検討では  $\alpha 60 \sim 80$  に陽性例は無く、ペプチドの長さの違いはあるが、MIR を含むペプチドで MG 患者血清抗体を検出できないとする Lennon ら<sup>20)</sup>、Barkas ら<sup>31)</sup>の既報に一致する。その一方で S-S 結合で構造修飾した KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT, CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC, KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C に 3.3%~16.7% の陽性例を認めた。この陽性率は、抗 MIR mAb との競合実験から MG 患者血清抗体の約 60% が MIR を標的とするという報告に対比して低く、十分な抗原性の回復は得られなかったと思われるが、患者血清抗体との反応においても構造修飾が抗原性強調に有効であることを示唆している。また同時に、合成ペプチド  $\alpha 67 \sim 76$  の MG 患者血清抗体への抗原性が減弱する原因の一つに立体構造の変化が関与することを支持する知見と思われる。一方アミノ酸置換の試みは、抗 MIR mAb との反応からは有望と思われたが、MG 患者血清抗体との反応には、少なくとも我々の用いた 4 種の置換は、抗原性強調に効果を示さなかった。抗 MIR mAb とヒト血清抗体との反応が必ずしも一致しないことは、抗 MIR mAb が種を越えて広く反応する一方で、ヒト患者血清抗体がシビレエイ AChR に反応しないことなどでも知られており<sup>20)</sup>、mAb の反応は強調された一側面であり、かならずしも全体像と一致しないことによると思われる。これら構造修飾されたペプチドと MG 患者血清抗体との反応を調べた報告はこれまでになく、一部の症例にせよ陽性例を得るペプチドを合成しえたことは、合成ペプチドを用いての治療を考えるうえにおいて重要と思われる。

## 結 論

MG 発症の主因である抗 AChR 抗体の抗原決定基として MIR (AChR  $\alpha 67 \sim 76$ ) が重要視されているが、この領域が合成ペプチドとして断片化された場合は、抗原性が著しく減弱するので、合成抗原としての MIR は病態解明、治療への応用に制約をうける。この抗原性回復を得るために立体構造修飾を試み、以下の結果を得た。

1. ELISA 法による検討で、抗 MIR mAb に対して、構造修飾されない  $\alpha 67 \sim 76$ ,  $\alpha 60 \sim 80$  に反応は得られなかったが、人工的に組み込んだ S-S 結合でターン構造を強調すべく作製された KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT, CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC, KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C の中で、CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC, KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C に強い反応が得られた。このことは、抗 MIR mAb に対する合成ペプチドの抗原性が立体構造修飾で強調しうることを意味しており、その一つの方法として S-S 結合組み込みによるターン構造強調を提示した。

2. CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC に関しては、水溶液中で実際に S-S 結合を有し、ターン構造をとることを、NMR 法による立

体構造解析で確認した。

3. 上記の構造修飾されたペプチドの中でも強い反応を示した KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C に関して、抗 MIR mAb に対する抗原性強調に有効とされるアミノ酸置換の、S-S 結合組み込みとの併用の効果を試みるため、KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow H$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $G^{73} \rightarrow R$ ,  $K^{76} \rightarrow A$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow H$ ), KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow R$ ) を作製し、ELISA 法による検討で、全てに抗 MIR mAb との反応を得た。また、なかでも KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C ( $K^{76} \rightarrow H$ ) はアミノ酸置換前の反応を上回り、S-S 結合組み込みとの併用においてもアミノ酸置換が抗原性強調に有効であることを示した。

4. 上記の構造修飾されたペプチド全てと、構造修飾されない  $\alpha 60 \sim 80$  に関して、二抗体免疫沈殿法を用い、MG 患者血清抗体との反応を調べ、アミノ酸置換を行わなかった KKCYG- $\alpha 67 \sim 76$ -VCT, CR- $\alpha 67 \sim 76$ -K ( $G^{74} \rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha 67 \sim 76$ -KC, KKC- $\alpha 63 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 62 \sim 77$ -C, KKC- $\alpha 61 \sim 77$ -C に本病患者 30 症例中 3.3%~16.7% の陽性例を得た。一方で構造修飾されない  $\alpha 60 \sim 80$  に陽性例は無かった。このことは抗 MIR mAb に対してだけでなく、MG 患者血清抗体との反応においても合成ペプチドを用いる際に見られる抗原性低下の回復に、立体構造修飾が有効であることを表している。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導、御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚の謝意を表わします。また研究を行うにあたり御協力頂きました本教室の奥村誠一博士、佐野正登博士に深謝致しますとともに本研究に御協力頂いた教室員各位に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Lindstrom, J.: Immunology of myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis, and Lambert-Eaton syndrome. *Ann. Rev. Immunol.*, 3, 109-131 (1985).
- 2) Numa, S., Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y. & Kikuyotani, S.: Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 48, 57-70 (1983).
- 3) Criado, M., Hochschwender, S., Sarin, V., Fox, J. L. & Lindstrom, J.: Evidence for unpredicted transmembrane domains in acetylcholine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 2004-2008 (1985).
- 4) Noda, M., Fukutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S. & Numa, S.: Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding  $\alpha$ -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, 305, 818-823 (1983).
- 5) Claudio, T., Vallivet, M., Patrick, J. & Hainemann, S.: Nucleotide and deduced amino acid sequence of Torpedo californica acetylcholine receptor  $\gamma$ -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 1111-1115 (1983).
- 6) Devillers-Thiery, A., Giraudat, J., Bentabollet, M. & Changeux, J. P.: Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: A model for the transmembrane

- organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 2067-2071 (1983).
- 7) **Finer-Moore, J. & Stroud, R.**: Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 155-159 (1984).
- 8) **Ratnam, M., Nguyen, D. L., Rivier, J., Sargent, P. B. & Lindstrom, J.**: Transmembrane topography of nicotinic acetylcholine receptor: Immunochemical tests contradict theoretical predictions based on hydrophobicity profiles. *Biochemistry*, **25**, 2633-2643 (1986).
- 9) **Tzartos, S. J. & Lindstrom, J.**: Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 755-759 (1980).
- 10) **Tzartos, S. J., Rand, D. E., Einarson, B. E. & Lindstrom, J. M.**: Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8635-8645 (1981).
- 11) **Tzartos, S. J., Seybold, M. E. & Lindstrom, J. M.**: Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 188-192 (1982).
- 12) **Tzartos, S. J., Langeberg, L., Hochschwender, S. & Lindstrom, J.**: Demonstration of a main immunogenic region on acetylcholine receptors from human muscle using monoclonal antibodies to human receptor. *FEBS Lett.*, **158**, 116-118 (1983).
- 13) **Tzartos, S. J., Kokla, A., Walgrave, S. L. & Conti-Tronconi, B. M.**: Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67-76 of the  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 2899-2903 (1988).
- 14) **Tzartos, S. J., Loutrari, H. V., Tang, F., Kokla, A., Walgrave, S. L., Milius, R. P. & Conti-Tronconi, B. M.**: Main immunogenic region of Torpedo Electropex and human muscle acetylcholine receptor: Localization and microheterogeneity revealed by the use of synthetic peptides. *J. Neurochem.*, **54**, 51-61 (1990).
- 15) **McCormick, D. J., Griesmann, G. E., Huang, Z. & Lennon, V. A.**: Synthetic  $\alpha$  subunit peptide 125-147 of human nicotinic acetylcholine receptor induces antibodies to native receptor. *Fed. Proc. Abstr.*, **45**, 919 (1986).
- 16) **Takamori, M.**: Synthetic peptides of acetylcholine receptor used as myasthenogenic antigens to help in the molecular identification of B cell and T cell epitopes. *Saishin-Igaku*, **44**, 1689-1696 (1989).
- 17) **Takamori, M., Okumura, S., Nagata, M. & Yoshikawa, H.**: Myasthenogenic significance of synthetic  $\alpha$ -subunit peptide 183-200 of Torpedo californica and human acetylcholine receptor. *J. Neurol. Sci.*, **85**, 121-129 (1988).
- 18) **Lennon, V. A. & Lambert, E. H.**: Monoclonal autoantibodies to acetylcholine receptors: evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 77-95 (1981).
- 19) **Lennon, V. A. & Lambert, E. H.**: Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature*, **285**, 238-240 (1980).
- 20) **Lennon, V. A. & Griesmann, G. E.**: Evidence against acetylcholine receptor having a main immunogenic region as target for autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology*, **39**, 1069-1076 (1989).
- 21) **Griesmann, G. E., McCormick, D. J. & Lennon, V. A.**: An avidin-biotin-peroxidase assay to detect synthetic peptides bound to polystyrene plates. *J. Immunol. Methods*, **138**, 25-29 (1991).
- 22) **Bolton, A. E. & Hunter, W. M.**: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent. *Biochem. J.*, **133**, 529-538 (1973).
- 23) **Wüthrich, K.**: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1st ed., p1-292, John Wiley & Sons Inc., New York, 1986.
- 24) **Braun, W. & Gö, N.**: Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints, A new efficient algorithm. *J. Mol. Biol.*, **186**, 611-626 (1985).
- 25) **Lindstrom, J., Tzartos, S. & Gullick, W.**: Structure and function of the acetylcholine receptor molecule studied using monoclonal antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 1-19 (1981).
- 26) **Dyson, H. J., Cross, K. J., Houghten, R. A., Wilson, I. A., Wright, P. E. & Lerner, R. A.**: The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. *Nature*, **318**, 480-483 (1985).
- 27) **Cung, M. T., Marraud, M., Hadjidakis, I., Bairaktari, E., Sakarellos, C., Kokla, A. & Tzartos, S.**: Two-dimensional  $^1\text{H}$ -NMR study of synthetic peptides containing the main immunogenic region of the Torpedo acetylcholine receptor. *Biopolymers.*, **28**, 465-478 (1989).
- 28) **Papadoulis, I., Potamianos, S., Hadjidakis, I., Bairaktari, E., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M. & Tzartos, S. J.**: Antigenic role of single residues within the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. J.*, **269**, 239-245 (1990).
- 29) **Cung, M. T., Tsikaris, V., Demange, P., Papadoulis, I., Tzartos, S. J., Sakarellos, C. & Marraud, M.**: 2D-NMR and molecular dynamics analysis of the Torpedo californica acetylcholine receptor  $\alpha$ 67-76 fragment and of its [Ala<sup>76</sup>]-analogue. *Peptide Res.*, **5**, 14-24 (1992).
- 30) **Papadoulis, I., Sakarellos, C. & Tzartos, S. J.**: High-resolution epitope mapping and fine antigenic characterization of main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 227-234 (1993).
- 31) **Barkas, T., Gabriel, J. M., Mauron, A., Hughes, G. J., Roth, B., Alliod, C., Tzartos, S. J. & Ballivet, M.**: Monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor bind to residues 61-76 of  $\alpha$  subunit. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5916-5920 (1988).
- 32) **Ashizawa, T., Ruan, K., Jinnai, K. & Atassi, M.**



Z.: Profile of the regions on the  $\alpha$ -chain of human acetylcholine receptor recognized by autoantibodies in myasthenia gravis. *Mol. Immunol.*, **29**, 1507-1514 (1992).

**Antigenicity of Synthesized Acetylcholine Receptor Peptides: Effects of Conformation Modification of Main Immunogenic Region on Antigenicity Reinforcement** Toshio Hamada, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **104**, 302—310 (1995)

**Key words** myasthenia gravis, main immunogenic region, synthetic peptide

#### Abstract

The main immunogenic region (MIR) has been known to be the target of most of the antibodies which cause antigenic modulation and passively transfer experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) against the acetylcholine receptor (AChR) in myasthenia gravis. MIR has been recently localized between residues  $\alpha$  67 and  $\alpha$  76 of the AChR  $\alpha$ -subunit, but synthetic peptides carrying MIR have not shown enough antigenicity in antibody assay. In order to reinforce the antigenicity of synthetic peptides carrying MIR, several conformation-modified model peptides, in which we tried to make the  $\beta$ -turn structure more intense by forming S-S bond, KKCYG- $\alpha$  67~76-VCT, CR- $\alpha$  67~76-K ( $G^{74}\rightarrow C$ ), CKGGLR- $\alpha$  67~76-KC, KKC- $\alpha$  63~77-C, KKC-62~77-C, and KKC- $\alpha$  61~77-C were synthesized. In addition, we synthesized KKC- $\alpha$  62~77-C ( $G^{73}\rightarrow H$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$  62~77-C ( $G^{73}\rightarrow R$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$  62~77-C ( $K^{76}\rightarrow H$ ), and KKC- $\alpha$  62~77-C ( $K^{76}\rightarrow R$ ), because such amino acid replacements have been reported to exhibit dramatic anti-MIR mAb binding enhancement. These peptides were studied in terms of the antigenicity reaction with anti-MIR mAb on ELISA. CKGGLR- $\alpha$  67~76-KC, KKC- $\alpha$  63~77-C, KKC- $\alpha$  62~77-C, KKC- $\alpha$  61~77-C, KKC- $\alpha$  62~77-C ( $G^{73}\rightarrow H$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$  62~77-C ( $G^{73}\rightarrow R$ ,  $K^{76}\rightarrow A$ ), KKC- $\alpha$  62~77-C ( $K^{76}\rightarrow H$ ), and KKC- $\alpha$  62~77-C ( $K^{76}\rightarrow R$ ) showed antigenicity, and antigenicity of KKC- $\alpha$  62~77-C ( $K^{76}\rightarrow H$ ) was more intense than peptides which had no amino acid replacement, whereas  $\alpha$  67~76 and  $\alpha$  60~80 had no antigenicity. These model peptides and a natural sequence peptide,  $\alpha$  60~80, were then studied respectively in terms of antigenicity to detect antibodies in human myasthenic sera on radioimmunoassay. The four model peptides, which do not have amino acid replacement, reacted with serum samples in 3.3%~16.7% of 30 myasthenic patients, while the  $\alpha$  60~80 and model peptides, which have amino acid replacement, reacted with none of them. These results suggest that modification of the conformation of the synthetic peptide may enhance the antigenicity, and attention should be paid to the conformational structure of the synthetic peptides used. This approach may help devise stratagems for antigen-specific therapy of immunoadsorption in myasthenia gravis.